

REC'D 15 AUG 2003

Rec'd PCT/PTO 29 DEC 2004

PCT/JP 03/08305

WIPO

PCT

30.06.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 7月 1日
Date of Application:

出願番号 特願 2002-227953
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP 2002-227953]

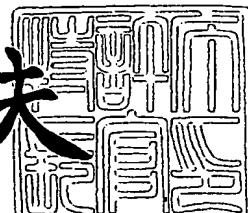
出願人 岡田 秀親
Applicant(s): 岡田 則子

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 T-070102-3
【提出日】 平成14年 7月 1日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】
【発明の名称】 H I V感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体
【請求項の数】 3
【発明者】
【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206
【氏名】 岡田 則子
【発明者】
【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206
【氏名】 岡田 秀親
【特許出願人】
【識別番号】 593186459
【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206
【氏名又は名称】 岡田 秀親
【連絡先】 電話番号 052-841-1009 または 052-85
3-8194
【特許出願人】
【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206
【氏名又は名称】 岡田 則子
【連絡先】 電話番号 052-841-1009 または 052-85
3-8195

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 H I V感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体及びH I V感染症治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 H I V感染細胞を特異的に認識しアポトーシスを誘導するヒトIgMに属することを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】 H I V感染細胞を特異的に認識し、H I V感染細胞にアポトーシスを誘導ヒトIgM抗体を有効成分として含有することを特徴とするH I V感染症治療剤。

【請求項3】 A I D Sの発症を防止するためのものである請求項2記載の治療剤。

◦

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、H I V感染細胞に特異的に反応し、H I V感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgMモノクローナル抗体及びかかる抗体を有効成分として含有するH I V感染症治療剤に関する

【0002】

【従来の技術】 H I V感染症に対しては、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼインヒビターとして種々の薬剤が開発されている。これらの薬剤を3種類ないし4種類を併用する多剤併用療法 (HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy) がH I V感染患者に有効性を発揮し、血中H I V量の激減やCD4リンパ球量の改善などをもたらすことが出来るようになった。

【0003】 しかし、多剤併用療法によっても潜伏感染細胞は排除できないので、H I V感染患者を治癒させることは難しく、薬剤投与を中止するとH I Vは再燃して増殖してしまう。

【0004】 多剤併用療法を間欠的に中断再開を繰り返すとH I Vに対する免疫応答が効率良く誘導される場合のあることが報告されているが、確実な治療法とはなっていない。しかしこれは、H I Vに対する免疫反応の重要性を示している

知見である。

【0005】HIV感染細胞に特異的に反応するヒト（型）モノクローナル抗体は、遺伝子組換によりヒト型化した抗体が作成されているが、それらはIgGタイプの抗体である。それらは、HIVの感染を阻害する中和抗体であるが、感染細胞を傷害することは出来ない。

【0006】ヒトの細胞膜の上には、種特異的補体制御膜因子群（DAF, Decay accelerating factor; MCP, Membrane cofactor protein; HRF20, 20kDa Homologous restriction factorなど）が存在し、同種のヒト補体の反応を防ぐために、補体反応を介した細胞溶解反応も起こらない。

【0007】一方、HIV感染細胞に反応するヒト血清中のIgM抗体は、HIV感染細胞を補体制御膜因子群に打ち勝ってヒト補体を介した細胞溶解反応起こることを発見した。HIV感染により発現が高まるGM2やGg4などのガングリオシドたいするIgM抗体がそのような作用を発揮することを知った。

【0008】ガングリオシドのGM2に対するヒトIgMモノクローナル抗体としてEBウイルスで不死化したヒトBリンパ芽球株が産生するL55が報告されており、このヒトIgMモノクローナル抗体を作用させたHIV感染細胞はヒト補体の反応を介して細胞溶解を起こすことがわかった。

【0009】しかし、L55抗体はHIV感染細胞に特異的なわけではないので、HIV感染細胞以外の正常細胞にも反応する可能性がある。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】HIV感染細胞に特異的に反応し、感染細胞にアポトーシスを誘導して破壊に導くヒトIgM抗体を有効成分とするHIV感染患者治療剤等を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、ヒトの免疫グロブリンに関する遺伝子を含む染色体を導入したキリンビール社製のマウス（TCマウス：transchromosome mouse）にHIV感染細胞を免疫して、HIV感染細胞に特異的に反応するヒト抗体を産生するマウ

スをえた。この免疫マウスの脾細胞をマウス骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを定法に従って作成し、そのハイブリドーマの中からHIV感染細胞に反応するモノクローナル抗体を産生するクローンを選び出し、そのハイブリドーマクローンを2G9細胞株と命名した。2G9細胞株が産生するモノクローナル抗体である2G9はヒト μ -鎖とヒト κ -鎖から成るヒトIgMモノクローナル抗体である。2G9はHIV感染細胞に特異的に反応するが、潜伏感染細胞株のOM10.1にも反応でき、これらの細胞にアポトーシスを誘導して破壊することができるなどを確認し、本発明を完成するに至った。

【0012】2G9と反応する抗原（2G9抗原）は、Western blottingで80kDa程度の分子量であると推定される。

【0013】2G9をコードするカッパー鎖及びミュー鎖それぞれにおける可変領域の遺伝子の塩基配列についての解析結果は、表1に示すとくである。定常領域については、既報の塩基配列とほぼ同様である。

【0014】

【表1】

μ -鎖可変領域の塩基配列：

```
TGCCCTGGATTCCAAGGCCTATCCACTTGGTGATCAGCACTGAGCACCGAGGATTACCATGGAACTGG
GGCTCCGCTGGGTTTCTGTTGCTATTAGAAGGTGTCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG
GGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTA
CTTATAGCATGAACGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTCATCCATTAGTAGTA
GTAGTAGTTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCACCTCCAGAGACAACGCCAAGA
ACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATC
TCCTTATAGCAGTGGCTGGCCACTGGGGCAGGGAACCTGGTACCGTCTCCTCA
```

κ -鎖可変領域の塩基配列：

```
CTCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGACTCCTGCTCTGGCTCC
CAGATACCAAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGCGAGTCAGGGATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGTCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTGCAATCAGGGTCCCCTCGGTTAGCAGCGGA
GTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCACAGCAGCCTGAGCAGCTGAAGATGTTGCAACTTATTACT
GTCAAAAGTATAACAGTCCCCGTACACTTTGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAA
```

【0015】OM10.1細胞も含め、HIV感染細胞に対して請求項1に記載の抗体、たとえば2G9はアポトーシスを起こさせる特徴をもつ。すなわち、これはHIV感染細胞を特異的にアポトーシスに陥らせることが出来る、ヒトIg

Mモノクローナル抗体であり、OM10.1等のHIV潜伏感染細胞などに対してもアポトーシスを誘導できるので、化学療法剤が効果を発揮することが出来ない感染患者の体内に潜む潜伏感染の排除するための治療剤になりうる。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施例により何ら制限されるものではない。

【0017】

【実施例1】2G9抗体の特異性

2G9抗体による、HIV感染細胞に対する反応性をフローサイトメトリー法で解析した。培養細胞株であるU937細胞、MOLT-4細胞およびCEM細胞を被験細胞として用いた。HIV感染細胞としては、U937細胞にHIV-1のIIB株を感染させたU937/IIB、臨床分離株であるmomoo株を感染させたU937/momo、MN株を感染させたU937/MNおよび、MOLT-4にIIB株を感染させたMOLT-4/IIBなどを用いた。それぞれの細胞に2G9抗体を作用させて洗浄後、蛍光色素で標識した抗ヒトIgM抗体で染色し、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。その結果、2G9抗体はHIV感染細胞のU937/IIB、U937/momo、U937/MNおよびMOLT-4/IIBを強く染色したが、非感染のU937細胞、MOLT-4細胞およびCEM細胞に対しては全く染色性を示さなかった。さらに、正常人の末梢血リンパ球および末梢血リンパ球をフィトヘモアグルチニン（PHA）で刺激して3日間培養した活性化リンパ球などについても解析を行ったが、これらも2G9抗体とは反応しなかった。したがって、2G9抗体はHIV感染細胞に特異的に反応し、正常細胞には反応しないことが明らかとなった。さらに、OM10.1細胞はHIV潜伏感染細胞株とされ、gp120などのHIVの抗原は通常は発現していない。ところが、2G9抗体はOM10.1細胞に対して反応したので、潜伏感染状態の細胞に対しても2G9抗体が反応しうることが示された。

【0018】

【実施例2】2G9抗体によるHIV感染細胞のアポトーシス

HIV-1を感染させたU937/IIIB、U937/MN、MOLT-4/IIIBなどの細胞を20%非働化ヒト血清を添加したRPMI1640培地に $1 \times 10^5 / \text{ml}$ に調製し、これに $12.5 \mu \text{g} / \text{ml}$ の2G9抗体を等容量加えて2日間5%炭酸ガス培養器中(37度C)で培養するとほとんどの細胞が死滅した。非感染細胞のU937細胞やMOLT-4細胞に対してはこの様な障害作用を全く示さなかった。感染細胞の障害はアポトーシスによるものであることはゲル電気泳動で細胞DNAの断片化を認めることにより確かめられた。

【0019】

【実施例3】2G9抗体によるHIV潜伏感染細胞のアポトーシス

HIV-1潜伏感染細胞株であるOM10.1細胞を20%非働化ヒト血清を含む細胞培養液(RPMI1640培地)中に $1 \times 10^5 / \text{ml}$ に調製し、これに $12.5 \mu \text{g} / \text{ml}$ の2G9抗体を等容量加えて2日間37度Cで培養した。培養後、アポトーシス検出試薬であるAnnexin Vで染色したあと、1%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定してフローサイトメトリーで解析した。2G9抗体を作用させてないときには5.8%の染色度であったものが、2G9抗体の存在下で培養した時には22.8%の染色度を示し、潜伏感染細胞のOM10.1細胞に対してもアポトーシスを誘導する作用が2G9抗体にあることが認められた。

【発明の効果】

【0020】HIV感染細胞を特異的にアポトーシスに誘導する本発明のヒトIgMモノクローナル抗体は全く新規な特性を持ったヒトIgM抗体であり、HIV感染患者の体内に潜むHIV感染細胞の排除に有効な治療剤として活用できる。化学療法剤の多剤併用療法と相乗効果を発揮し、多剤併用療法だけでは治癒させることのできないHIV感染患者の治癒に導くことも期待できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 H I V 感染細胞に特異的に反応してアポトーシスを誘導するヒト I g M抗体および該ヒト I g M抗体を有効成分とするH I V 感染の予防剤や治療剤等を提供すること。

【課題の解決手段】 免疫グロブリンの遺伝子に関わるヒト染色体を導入したマウスにH I V 感染培養細胞を免疫した動物の脾細胞をマウス骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマを作成し、クローニングしたハイブリドーマで、H I V 感染細胞に特異的に反応し、H I V 感染細胞やH I V 潜伏感染細胞にアポトーシスを誘導するヒト I g Mモノクローナル抗体を產生する細胞株を得た。

【選択図】 「なし」

出願 2002-227953

出願人履歴情報

識別番号 [593186459]

1. 変更年月日 1993年10月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県福岡市城南区千隈1丁目5番1号
氏 名 岡田 秀親

2. 変更年月日 1996年 3月 29日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番1号 エクレール桜
山206号
氏 名 岡田 秀親

出願 2002-227953

出願人履歴情報

識別番号 [502282571]

1. 変更年月日 2002年 7月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール

桜山206

氏 名 岡田 則子